DOI:10.11931/guihaia.gxzw201909051

响应面法优化当归中阿魏酸和藁本内酯提取工艺研究

张瑜[1]，李欠*，黄翔，冯彦梅，杨兰，邱黛玉

（1. 甘肃省干旱生境作物学重点实验室，兰州 730070；2. 甘肃农业大学农学院，兰州 730070；
3. 甘肃省中药材规范化生产技术创新重点实验室，兰州 730070）

摘要：为优化中药材当归中主要活性成分阿魏酸和藁本内酯同时提取的最佳工艺条件，为当归的有效开发利用提供参考。该文以超声波辅助响应面优化当归中阿魏酸和藁本内酯提取工艺，采用氢核磁共振定量方法同时测定当归中阿魏酸、藁本内酯的含量。优化工艺以阿魏酸和藁本内酯含量的综合评分为考察指标，选取乙醇浓度、提取时间、液料比三个主要因素，采用单因素筛选结合 Box-Behnken 中心组合设计试验优化提取工艺参数。实验结果表明优化的最佳提取工艺条件为:乙醇浓度 80.87%，液料比 13.04 mL·g-1，提取时间 30.14 min，验证试验结果与预测值一致。氢核磁共振定量方法以氘代二甲基亚砜为测试溶剂，吡嗪为内标物，其中吡嗪，阿魏酸和藁本内酯的定量共振峰分别为δ 8.66 ppm，δ 6.37-6.35 ppm 和δ 5.55-5.53 ppm，该方法的精密度、稳定性、重复性和加标回收率良好，定量限和检测限较低，能够满足实际分析测试需要。综上所述，利用响应面法对提取工艺条进行优化，实验结果准确可靠，重现性良好，适用于当归中阿魏酸和藁本内酯的同时提取；氢核磁共振定量方法操作简单、分析速度快、专属性强，可用于当归中阿魏酸和藁本内酯的同时测定。

关键词：提取工艺，当归，Box-Behnken 响应面法，氢核磁共振

Response surface methodology optimization for extraction of ferulic acid and ligustilde from *Angelicae Sinensisis*

ZHANG Yu[1], LI Qian*, HUANG Xiang, FENG Yanmei, YANG Lan, QIU Daiyu

(1. *Gansu Provincial Key Laboratory of Aridland Crop Science*, Lanzhou 730070, China; 2. *College of Agronomy, Gansu Agricultural Univ.ersity*, Lanzhou 730070, China；3. *Gansu Provincial Key Laboratory of Good Agricultural Productive Technology for Traditional Chinese Medicines*, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The purpose of this study is to optimize the optimum technological conditions for the simultaneous extraction of ferulic acid and ligustilide, the main active components in *Angelica sinensis*, and to provide reference for the effective development and utilization of *Angelica sinensis*. In this experiment, the extraction process of ferulic acid and ligustilide from *Angelica sinensis* was optimized by ultrasonic assisted response surface, which taking the comprehensive score of ferulic acid and ligustilide content as the evaluation index and the ethanol concentration, extraction time and solid-liquid ratio were selected as the three main factors, and the contents of ferulic acid and ligustilide in *Angelica sinensis* were determined by ^{1}H-qNMR. Single factor screening combined with Box-Behnken central combination design test was used to optimize the extraction process. The single-factor screening results showed that a high comprehensive score was obtained under the three conditions of 80% ethanol concentration, liquid-to-solid ratio was 12 mL·g-1, or 30 min extraction duration. Based on this, the Behnken center combination design test was designed and implemented. The results showed that the influence degree of each experimental factor on the comprehensive score was the ethanol concentration, the liquid-to-solid ratio was the second, and the extraction time was the least. The best optimum extraction conditions were as follows: ethanol

基金项目：国家自然科学基金（31860102）；甘肃省自然科学基金（18JR3RA185）；甘肃农业大学盛彤笙科技创新基金（GSAU-STS-2037）；人才引进专项（GSAU-RCZX201704）[Supported by the National Natural Science Foundation of China (31860102); Natural Science Foundation of Gansu Province (18JR3RA185); Shengtongsheng Science and Technology Innovation Fund of Gansu Agricultural University (GSAU-STS-2037); Talent Introduction Program (GSAU-RCZX201704)]。

作者简介：张瑜(1989-)，女，陕西黄龙县人，在读硕士研究生，主要研究方向为中药分析及质量评价，(E-mail) 308641231@qq.com。
***通信作者：**李欠（1984-），博士，讲师，研究方向为中药分析及质量评价，(Email) liqian1984@gsau.edu.cn。

concentration was 80.87%, liquid-to-solid ratio was 13.04 mL · g-1, extraction duration was 30.14 min. The verification test results are consistent with the predicted values. The quantitative resonance peaks of pyrazine, ferulic acid and ligustilide were δ 8.66 ppm, δ 6.37-6.35 ppm and δ 5.55-5.53 ppm, respectively, using DMSO-d_6 as solvent and pyrazine as internal standard substance by ^{1}H-qNMR. The precision, stability, repeatability and recovery of the method were good, and the limits of quantification and detection were low, which can meet the needs of practical analysis and testing. To sum up, the optimization method of response surface method was used to optimize the extraction process, the experimental results were accurate and reliable, good reproducibility, and suitable for the simultaneous extraction of ferulic acid and ligustilide in *Angelica sinensis*. The ^{1}H-qNMR method had the advantages of simple operation, fast analysis speed and strong specificity, and could be used for the simultaneous determination of ferulic acid and ligustilide in *Angelica sinensis*.

Key words: extraction process, *Angelicae Sinensisis*, Box-Behnken response surface method, ^{1}H-qNMR

中药材当归是伞形科当归属植物当归*Angelica Sinensis* (Oliv.) Diels的干燥根（国家药典委员会，2015），具有补血活血、调经止痛、润肠通便的作用，是我国临床最常用中药之一（董晴和陈明苍，2016；国家药典委员会，2015）。当归中主要含有的生物活性成分有挥发油、有机酸类、多糖以及黄酮等（赵雪娇等，2013；周桂生等，2012）。其中阿魏酸是当归中有机酸类的代表，属于较早分离出来的有效成分之一（赵雪娇等，2013）。挥发油在当归中含量约为1%，是当归的重要有效成分之一，其中又以藁本内酯含量为最高。2015年版《中国药典》以阿魏酸的含量测定和其他常规鉴别项目作为当归质量控制的手段和指标（国家药典委员会，2015），而对藁本内酯含量并未作出明确规定。

近年来，响应面法和氢核磁定量方法分别在中药有效成分的提取和含量测定方面得以广泛应用（高伟等，2017，林珊等，2014；Tanaka et al.，2019；王志伟等，2016；户宪珍等，2019；黄翔，2019；刘伟等，2014；Sun et al.，2017；Xu et al.，2013；王红等，2019；赵昱玮，2016；周吉等，2019）。氢核磁定量方法测试时间非常短（2-5 min 即可完成），特征峰化学位移在不同仪器之间重现性好，且定量过程中不需要使用对照品，通过廉价易得的内标物即可完成定量，可以有效降低成本（高伟等，2017，林珊等，2014；Tanaka R et al.，2019；王志伟等，2016）；响应面优化提取方法与常用的正交实验法相比具有很多优点：响应面法的实验次数相对较少，检测精确度高、预测的函数模型相对准确、所预测的函数模型能够准确的反映实验因素和预测结果之间关系，得以广泛应用（户宪珍等，2019；黄翔，2019；Sun JC et al.，2017; Xu Q et al.，2013；王红等，2019；赵昱玮，2016；周吉等，2019）。该文以阿魏酸和藁本内酯成分含量的综合评分为响应值，使用 Design-Expert 10.0.4.0 软件进行试验设计，优化当归提取工艺，为当归应用和质量标准建立提供参考。

1. 材料与方法

1.1 实验仪器与材料

核磁共振波谱仪（Bruker Advance III 600），AL-104 电子分析天平（慈溪市天东衡器厂），KQ-500B 超声波清洗仪（深圳市得康科技有限公司），旋转蒸发仪 R-101N（郑州长城科工贸有限公司），恒温水浴锅（江苏正基有限公司）。

对照品阿魏酸（批号：FD170255）购自萨恩化学技术有限公司，藁本内酯购自北京库来搏科技有限公司，纯度>98%；吡嗪购自上海麦克林生化科技有限公司；DMSO-d_6（氘代纯度，99.9%）购自萨恩化学技术有限公司。当归药材购自甘肃岷县经甘肃农业大学中药学教研室邱黛玉副教授鉴定为中药当归。

1.2. 实验方法

1.2.1 氢核磁共振测试条件

DMSO-d_6 为测试溶剂，吡嗪为内标物。吡嗪，阿魏酸和藁本内酯的定量共振峰分别为δ 8.66 ppm，δ 6.37-6.35 ppm，δ 5.55-5.53 ppm。

采用 zg30 脉冲序列，谱宽(SWH)为 11904.8 Hz，弛豫时间(D1)为 1 s，脉冲宽度(P1) 14.90 s，样品扫描次数(NS) 32 次。所有数据均使用 MestReNova 软件处理。

1.2.2 溶液的制备

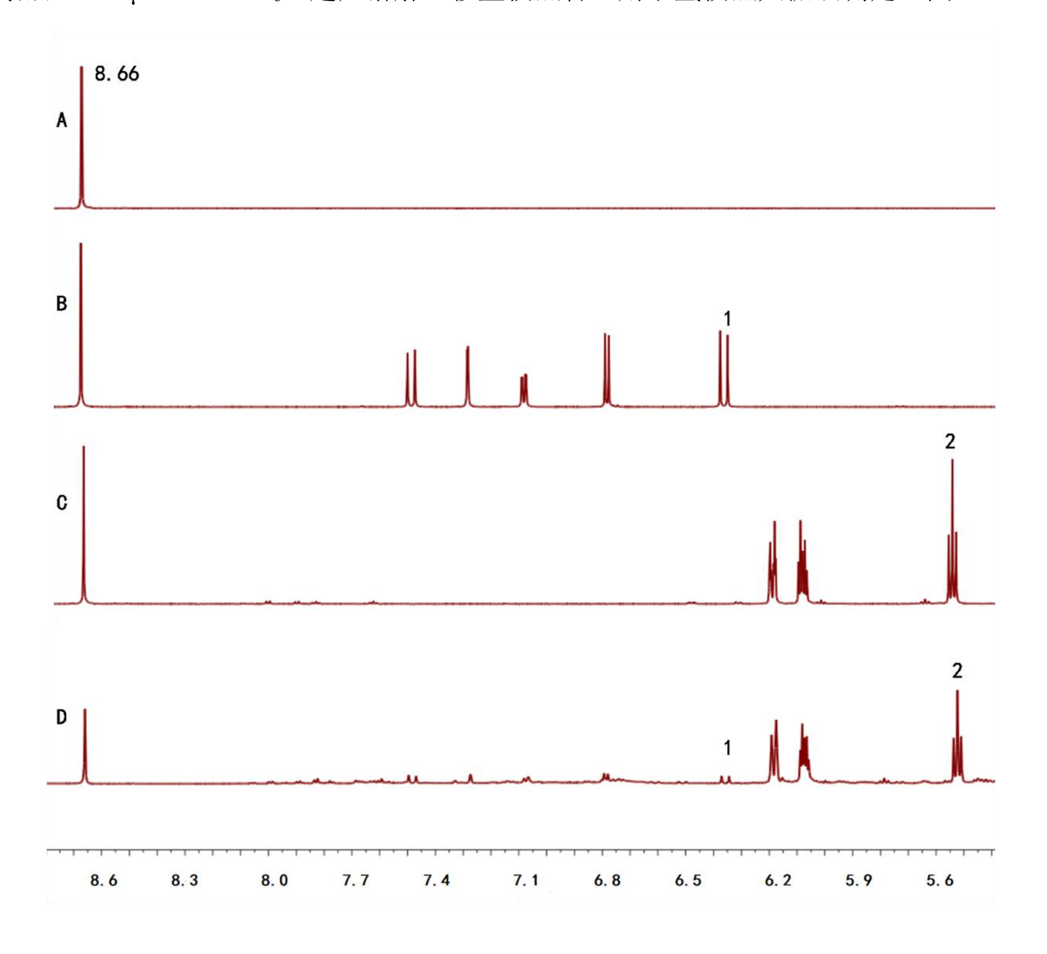
内标溶液的制备：准确称取 19.70 mg 内标物吡嗪溶解至 3.94 mL DMSO-d_6 中，制得 5.00 mg·mL-1 内标溶液，以作为用于 ^{1}H-qNMR 样品定量的内标样品；准确称取 7.50 mg 内标物吡嗪溶解至 0.75 mL DMSO-d_6

中，制得 10.00 mg·mL-1 内标溶液，以作为用于线性关系考察时 ^{1}H-qNMR 定量的内标样品。

对照品溶液的制备：准确称取 22.00 mg 阿魏酸对照品溶解至 2 mL DMSO-d_6 溶液中，制得 11.00 mg·mL-1 阿魏酸对照品溶液；准确称取 59.00 mg 藁本内酯对照品溶解至 2 mL DMSO-d_6 溶液中，制得 29.50 mg·mL-1 藁本内酯对照品溶液备用。

当归提取物的制备：取药材粉末(过 40 目筛)约 10.00 g，精密称定，置于容量瓶中，加入 90%乙醇 100 mL，超声处理（40 min，40 ℃），抽滤，重复 2 次，合并滤液，于 50 ℃减压回收溶剂至无醇味，用 2 倍量乙酸乙酯萃取 2 次，合并乙酸乙酯，于 70 ℃ 水浴上旋干得粗浸膏并称重。

供试品溶液的制备：取上述浸膏 20 mg，精密称定，加内标溶液吡嗪 50 μL（吡嗪 19.70 mg，溶于 3.94 mL DMSO-d_6），再加入 450 μL DMSO-d_6，超声溶解，移置核磁管，用于氢核磁共振法测定（图 1）。



注：**A.** 吡嗪；**B.** 阿魏酸对照品；**C.** 藁本内酯对照品；**D.** 当归提取物；**1.** 阿魏酸定量峰；**2.** 藁本内酯定量峰；δ=8.66 为内标物吡嗪定量峰。

Note：**A.** Pyrazine；**B.** Ferulic Acid Standard；**C.** Ligustilide Standard；**D.** Angelica extract；**1.** Quantitative peak of Ferulic Acid；**2.** Quantitative peaks of Ligustilide；The peak of 8.66 is the quantitative peak of Pyrazine.

图 1：氢核磁共振波谱图

Fig. 1：^{1}H-NMR Spectra

1.2.3 方法学考察

1.2.3.1 线性关系考察

取“1.2.2”项下对照品储备液 400、200、100、50、25 和 13 μL 装入核磁管，加入内标溶液吡嗪 50 μL（吡嗪 7.5 mg， 溶于 0.75 mL DMSO-d_6），再依次加入 DMSO-d_6 50、250、350、400、425、437 μL，即得 8.80、4.40、2.20、1.10、0.550、0.286 mg·mL-1 阿魏酸对照品溶液和 23.6、11.8、5.90、2.95、1.48、0.767 mg·mL-1 藁本内酯对照品溶液系，进行 ^{1}H-NMR 测定。

1.2.3.2 精密度考察

取“1.2.2”项下对照品溶液，按“1.2.1”项下核磁条件，重复测定 5 次，以对照品定量峰面积与内标物定量峰面积的比值计算阿魏酸和藁本内酯的 RSD 值。

1.2.3.3　重复性试验

平行制备 6 份供试品溶液，在同一实验条件下测定，以样品定量峰面积与内标物定量峰面积的比值计算阿魏酸和藁本内酯的 RSD 值。

1.2.3.4　稳定性试验

将供试品溶液在室温下放置，时间分别为 0、2、4、8、10、12 和 24 h，然后进行稳定性实验测定，以样品定量峰与内标物定量峰面积比值计算阿魏酸和藁本内酯的 RSD 值。

1.2.3.5　加样回收率试验

制备 5 份已知含量的当归药材样品浸膏供试液，分别加入藁本内酯和阿魏酸对照品 DMSO-d_6 溶液，按照“1.2.1”项下的条件测定，计算回收率和 RSD 值。

1.2.4　检出限和定量限

^{1}H-qNMR 检出限(LOD)和定量限(LOQ)可由 LOD = 3.3 σ / S，LOQ = 10 σ / S 计算得出（σ指回归线的剩余标准差，S 指非零截距线性回归曲线斜率）。

1.2.5　样品含量测定

按“1.2.2”项下“供试品溶液制备”方法平行制备试验样品溶液 2 份，并按照“1.2.1”项核磁共振测试条件下进行重复测定 2 次，计算样品的含量平均值。

1.2.6　数据标准化处理

按照标准化处理公式，将单因素试验结果和响应面试验的结果进行数据标准化处理，最终得到 2 种指标成分的综合评分。

1.2.7　单因素试验设计

以藁本内酯和阿魏酸 2 种成分提取含量作为综合评分的考察指标，分别考察提取溶剂乙醇浓度、提取时间和液料比三个因素对藁本内酯和阿魏酸提取率的影响。

1.2.8　响应面试验设计

以上述优化后的各单因素值为基础，通过 Design-Expert 10.0.4.0 软件 Box-Behnken 响应面设计，对乙醇浓度、液料比、提取时间 3 个因素结果进一步优化，重复试验，并进行分析。

2.　结果与分析

2.1　方法学考察

2.1.1　线性关系考察

分别以对照品的积分面积 X 与对照品溶液浓度 Y 做线性回归，得出回归方程分别为阿魏酸 $Y=7.007X+0.016$，$R^2=0.999$，线性范围 0.286-8.80 mg·mL-1；藁本内酯 $Y=7.223X+0.211$，$R^2=0.999$，线性范围 0.767-23.6 mg·mL-1。

2.1.2　精密度考察

以对照品定量峰面积与内标物定量峰面积的比值计算阿魏酸和藁本内酯的 RSD 值分别为 1.41%、0.34%。表明仪器精密度良好。

2.1.3　重复性试验

以样品定量峰面积与内标物定量峰面积的比值计算阿魏酸和藁本内酯的 RSD 值分别为 1.50%、1.54%，表明该方法具有良好的重复性。

2.1.4　稳定性试验

以样品定量峰与内标物定量峰面积比值计算阿魏酸和藁本内酯的 RSD 值分别为 2.21%、1.62%，表明供试品溶液 24 h 稳定。

2.1.5　加样回收率试验

阿魏酸和藁本内酯的回收率分别为 95.2%~102.3% (RSD = 2.91%)和 97.7%~103.7% (RSD = 2.41%)，平均回收率分别为 98.6%和 100.24%，加样回收率良好。

2.2　检出限和定量限

计算得出阿魏酸 LOD = 21.11 μg·mL-1，LOQ = 63.97 μg·mL-1；藁本内酯 LOD = 58.76 μg·mL-1，LOQ =

178.07 μg·mL-1。

2.3 单因素试验结果

表 1 为单因素试验设计方案，平行提取 3 次。表 2 为数据标准化处理结果。从表 2 可以看出，综合评分随着乙醇体积分数的增大先上升趋势随后开始降低。当乙醇体积分数为 80%左右时，综合评分达到最高值，表明此时阿魏酸和藁本内酯溶解度最大，因此选择 80%乙醇体积分数作为最优选择。液料比在大于 12 后，综合评分变化趋于平缓，表明溶剂中阿魏酸和藁本内酯含量趋于平稳，最佳液料比为 12 时即可溶出大部分有效成分。综合评分在 10~30 min 时逐渐增大，30 min 左右趋于稳定，40 min 以后综合评分有少许下降，因此 30 min 为最优超声时间。

表 1 单因素试验条件

Table 1 Single factor test condition

因素 Factor	变化条件 Changing conditions	固定条件 Fixed condition
乙醇浓度 Ethanol concentration	50、60、70、80、90 (%)	液料比 12 mL·g-1，提取时间 40 min，温度 40 ℃ The solid-liquid ratio was 12 mL·g-1, extraction duration was 40 min, extraction temperature was 40 ℃
液料比 Solid-to-liquid ratio	4、8、12、16、20 (mL·g-1)	乙醇浓度 90%，提取时间 40 min，温度 40 ℃ The ethanol concentration was 90% , extraction duration was 40 min, extraction temperature was 40 ℃
提取时间 Extraction duration	10、20、30、40、50 (min)	乙醇浓度 90%，液料比 12 mL·g-1，温度 40 ℃ The ethanol concentration was 90%, solid-liquid ratio was 12 mL·g-1, extraction temperature was 40 ℃

表 2 单因素考察结果

Table 2 Single factor investigation result

因素 Factor	水平 Level	阿魏酸(mg·g-1) Ferulic acid	藁本内酯(mg·g-1) Ligustilide	综合评分 Z-score
乙醇浓度(%)	50	0.48(-1.43)	3.11(-1.29)	-2.73
Ethanol concentration	60	0.64(-0.49)	3.78(-0.79)	-1.28
	70	0.82(0.58)	4.59(-0.18)	0.40
	80	0.98(1.53)	6.64(1.36)	2.89
	90	0.69(-0.19)	6.04(0.91)	0.72
液料比(mL·g−1)	4	0.43(-1.97)	4.12(-1.99)	-3.96
Solid-to-liquid ratio	8	0.64(0.14)	5.86(0.33)	0.87
	12	0.69(0.64)	6.04(0.57)	1. 53
	16	0.63(0.29)	6.04(0.57)	0.86
	20	0.63(0.29)	6.01(0.53)	0.82
提取时间(min)	10	0.52(-1.96)	3.47(-2.00)	-3.95
Extraction duration	20	0.68(0.31)	6.25(0.55)	0.87
	30	0.72(0.88)	6.43(0.72)	1.60
	40	0.69(0.45)	6.04(0.36)	0.82
	50	0.68(0.31)	6.02(0.34)	0.66

注：括号内为标准化处理后的数据。

Note: Brackets for standardized processing of test data.

2.4 响应面实验结果

2.4.1　响应面试验设计方案

以乙醇浓度（A）、液料比（B）、提取时间（C）作为该响应面试验设计的三个自变量，以阿魏酸和藁本内酯含量的综合评分作为响应值（*R*），采用 Box-Behnken 方法进行试验设计，试验设计方案和结果见表 3。

2.4.2　模型显著性分析

本研究采用 Design-Expert 10.0.4.0 软件对表 3 中数据进行处理，经拟合得到回归方程为 $R=2.09+0.47A+0.13B+0.19C-0.12AB+0.44AC-0.38BC-3.29A^2-0.73B^2-0.43C^2$，调整系数为 0.9927，决定系数（$r^2$）＝0.9968，表明回归方程拟合度好，试验误差小，此模型可用于该试验的分析。

表 4 为方差分析和显著性检验结果，结果说明乙醇浓度、液料比、提取时间和乙醇浓度与液料比、提取时间与液料比的交互作用对综合评分有显著的影响。各试验因素对综合评分影响顺序为乙醇浓度（A）＞液料比（C）＞提取时间（B）。

2.4.3　最佳提取工艺参数预测及实验验证

通过观察图 2 可知，乙醇浓度与液料比，乙醇浓度与提取时间的 3D 曲面图的倾斜度较高，说明因素间交互作用显著，对当归中两种有效成分提取的影响较显著。以阿魏酸和藁本内酯两种成分评分最大值为目标，由软件分析，得出这两种指标成分的最佳提取条件为乙醇浓度 80.87%，液料比 13.04，提取时间 30.14 min。为了方便实际操作，将提取条件参数进行合理修正：乙醇浓度 81%，液料比 13，提取时间 30 min，重复提取 3 次进行验证，试验结果如表 5 所示，综合评分的平均值为 2.20，与预测值 2.14，相差 2.80%，说明该试验方法准确度高，稳定可靠，可用于当归中 2 种成分的含量测定。

表 3　响应面实验设计与结果

Table 3　Response surface experiment result

编号 Index	A(%) Ethanol concentration	B(min) Extraction duration	C Solid-to-liquid ratio	两种成分含量(mg·g-1) Content of two components		综合评分 Z-score
				阿魏酸 Ferulic acid	藁本内酯 Ligustilide	
1	90(1)	40(1)	12(0)	0.69(-1.51)	6.04(-0.08)	-1.59
2	80(0)	30(0)	12(0)	1.03(1.00)	6.94(0.88)	1.88
3	80(0)	40(1)	16(1)	0.97(0.56)	6.53(0.44)	1.00
4	90(1)	30(0)	8(-1)	0.75(-1.06)	5.53(-0.63)	-1.69
5	80(0)	20(-1)	16(1)	0.98(0.63)	6.77(0.70)	1.33
6	70(-1)	30(0)	16(1)	0.81(-0.62)	4.41(-1.82)	-2.44
7	70(-1)	30(1)	12(0)	0.82(-0.55)	4.59(-1.63)	-2.18
8	80(0)	20(-1)	8(-1)	0.84(-0.40)	6.59(0.50)	0.10
9	80(0)	30(0)	12(0)	1.05(1.15)	6.97(0.91)	2.06
10	90(1)	30(0)	16(1)	0.76(-0.99)	6.56(0.47)	-0.52
11	80(0)	30(0)	12(0)	1.06(1.22)	6.96(0.90)	2.12
12	80(0)	30(0)	12(0)	1.07(1.30)	6.94(0.88)	2.18
13	70(-1)	30(0)	8(-1)	0.84(-0.40)	4.76(-1.45)	-1.85
14	70(-1)	20(-1)	12(0)	0.79(-0.77)	4.49(-1.74)	-2.50
15	90(1)	20(-1)	12(0)	0.68(-1.58)	6.25(0.14)	-1.44
16	80(0)	30(0)	12(0)	1.08(1.37)	6.93(0.87)	2.24
17	80(0)	40(1)	8(-1)	0.98(0.63)	6.73(0.65)	1.29

注：括号内为标准化处理后的数据。

Note: Brackets for standardized processing of test data.

表 4　方差分析

Table 4 Analysis of variance

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Freedom	均方 Mean square	*F* 值 F value	*P* 值 P value	方差来源 Source of variance	平方和 Sum of square	自由度 Freedom	均方 Mean square	*F* 值 F value	*P* 值 P value
模型 Model	54.38	9	6.04	243.69	< 0.0001	A^2	45.53	1	45.53	1836.34	< 0.0001
A	1.74	1	1.74	70.15	< 0.0001	B^2	2.26	1	2.26	91.31	< 0.0001
B	0.13	1	0.13	5.35	0.0540	C^2	0.78	1	0.78	31.51	0.0008
C	0.29	1	0.29	11.65	0.0112	残差 Residual	0.17	7	0.025		
AB	0.055	1	0.055	2.23	0.1792	失拟项 Missing Item	0.099	3	0.033	1.76	0.2928
AC	0.77	1	0.77	31.24	0.0008	纯误差 Pure error	0.075	4	0.019		
BC	0.58	1	0.58	23.30	0.0019	总和 Total	54.55	16			

注：$P<0.05$ 为显著项，$P<0.01$ 为极显著项。

Note: $P < 0.05$ significant difference, $P < 0.01$ more significant difference.

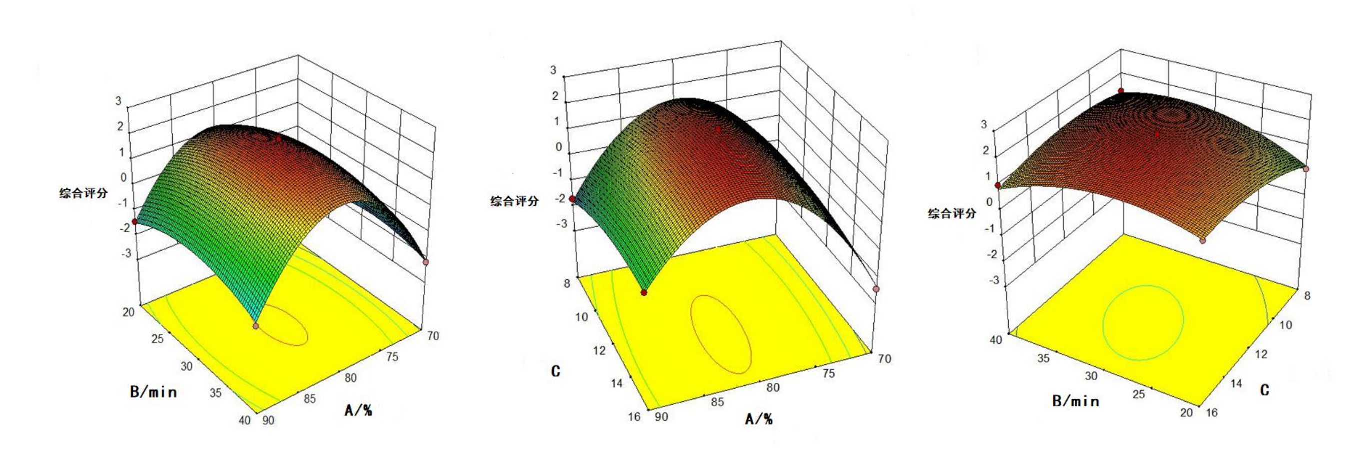


图 2 响应面图

Fig. 2 Optimized response surface map

表 5 验证结果

Table 5 The results of verification

序号 Index	阿魏酸(mg·g-1) Ferulic acid	藁本内酯(mg·g-1) Ligustilide	综合评分 Z-score
1	1.07(1.30)	7.01(0.95)	2.25
2	1.04(1.07)	6.98(0.92)	2.00
3	1.09(1.45)	6.96(0.90)	2.34
AVG	1.07	6.98	2.20

注：括号内为标准化处理后的数据。

Note: Brackets for standardized processing of test data.

3 讨论

提取溶剂选择：本试验使用不同浓度的乙醇和甲醇分别对当归粉末进行提取。研究发现采用乙醇提取制备的浸膏中阿魏酸和藁本内酯含量均比甲醇高，且由于乙醇毒性较小，更加绿色环保，适应于工业化生产，所以选择乙醇作为提取溶剂。

氘代溶剂和内标物质的选择：合适的氘代溶剂对样品和内标均应具有良好的溶解性。内标应具有一个易于识别且不与待测峰重叠的谱峰。通过文献比较和筛选试验，选择廉价易得、性质稳定、不与待测物质发生反应、不与待测物的谱峰重叠的吡嗪作为内标物，其氢核磁峰在 8.66 ppm；此外，DMSO-d_6 能够很好的溶解待测样品和内标物质，且不与其它峰重叠，因此选择选择 DMSO-d_6 为溶剂。

响应面法具有实验周期短、检测精度高、预测函数模型准确、能研究几种因素间交互作用、试验设计合理和结果准确等优点，因此采用响应面法在中药提取优化工艺方面应用广泛（户宪珍等，2019；黄翔，2019；Sun JC et al.，2017；Xu Q et al.，2013；王红等，2019；赵昱玮，2016；周吉等，2019；）。本试验通过对乙醇浓度、液料比、提取时间三个因素进行考察，结果显示这三个单因素对当归药材中阿魏酸和藁本内酯两种成分同时提取有较大影响，并结合Box-Behnken中心组合设计试验进行提取工艺优化，优选出最佳提取工艺，为当归的有效开发利用提供参考。

目前当归中有效成分含量测定主要采用HPLC法，其具有流动相配备复杂、检测时间长、使用对照品等缺点。氢核磁共振定量法具有检测速度快、准确性高、重现性好、避免使用昂贵的对照品只需要使用少量廉价的内标物质即可同步对多种成分进行含量测定等优点，已广泛应用于中药有效成分含量的测定（高伟等，2017，林珊等，2014；Tanaka et al.，2019；王志伟等，2016）。本研究采用氢核磁共振法同时测定当归中阿魏酸和藁本内酯含量，可以有效的降低成本，并且整个检测过程在3分钟左右即可完成。

4 结论

该文以中药当归为研究对象，以氢核磁定量方法测定当归提取物中阿魏酸和藁本内酯含量，以阿魏酸和藁本内酯含量的综合评分为考察指标，采用单因素筛选结合Box-Behnken中心组合设计试验优化提取工艺参数，研究结果发现：

(1)当归中阿魏酸和藁本内酯的最佳提取工艺为：乙醇浓度80.87%，液料比13.04 mL·g-1，提取时间30.14 min，在此条件下，2种成分提取综合评分为2.14。

(2)在最佳提取工艺条件下，测得当归中阿魏酸和藁本内酯含量分别为1.07 mg·g-1和6.98 mg·g-1，且该工艺条件操作简单，重复性好，对当归中有效成分提取有一定的参考价值。

参考文献：

DONG Q, CHEN MC, 2016. Research progress in chemical constituents and pharmacological action of *Angelica*[J]. Asia-Pac Trad Med, 12(2): 32-34. [董晴，陈明苍，2016. 当归化学成分及药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药，12(2)：32-34.]

GAO W, SUN L, WANG QH, et al., 2017. Determination of Phenanthrenes in the Anxiolytic Fraction of *Juncus effusus L*. by QNMR[J]. Chin Pharmacol J, 52(22): 2042-2046. [高伟，孙璐，王勤辉，等，2017. 定量核磁共振波谱测定灯心草抗焦虑有效部位菲类成分的含量[J]. 中国药学杂志，52(22)：2042-2046.]

State Pharmacopoeia Commission. ChP (Volume 1, 2015)[S]. Beijing: Chemical Industry Press, 2015 [国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015 年版一部)[S]. 北京：化学二业出版社, 2015.]

HUANG X, GUO YH, JIA CQ, et al., 2019. Extraction parameters and drying methods of *Cistanche deserticola*[J]. Chin Tradit Herb Drug, 50(15): 3622-3630. [黄翔，郭晔红，贾存勤，等，2019. 肉苁蓉提取工艺及干燥方式研究[J]. 中草药，50(15)：3622-3630.]

HU XZ, YANG CH, YANG WJ, et al., 2019. Optimization of extraction process of bergenin from *Radix Ardisiae crenatae* by response surface method[J]. Northwest Pharm J, 34(04):458-462. [户宪珍，杨长花，杨文娟，等，2019. 响应面法优化超声辅助提取朱砂根中岩白菜素的提取工艺[J]. 西北药学杂志，34(04)：458-462.]

LIN S, SU J, YE W, et al., 2014. Application progress in quantitative NMR in analysis of traditional Chinese medicine[J]. The J Pharm Pract, 32(02): 92-95+106. [林珊，苏娟，叶雯，等，2014. 定量核磁共振技术在中药分析中的应用进展[J]. 药学实践杂志，2014，32(02)：92-95+106.]

SUN JC, WU YT, DONG SJ, et al., 2017. Quantitative studies of rhubarb using quantitative analysis of multi-components by single marker and response surface methodology[J]. J Sep Sci, 40(19): 3792-3800.

Tanaka R, Inagaki R, Sugimoto N, et al., 2017. Application of a quantitative ^{1}H-NMR (^{1}H-qNMR) method for the determination of geniposidic acid and acteoside in *Plantaginis semen*[J]. J Nat Medtokyo, 71(1): 315-320.

Xu Q, Shen Y Y, Wang H F, et al., 2013. Application of response surface method-ology to optimise extraction of flavonoids from fructus *sophorae*[J]. Food Chem, 138(4): 2122-2129.

WANG H, WU QN, CUI YW, et al., 2019. Study on Optimization of the Extraction Technology of Total Vitamin E in *Euryale ferox* by Box-Behnken Design-response Surface Methodology[J]. China Pharm, 30(11): 1497- 1501. [王红，吴启南，崔永伟，等，2019. Box-Behnken 设计-响应面法优化芡实中总维生素 E 的提取工艺研究[J]. 中国药房，30(11)：1497- 1501.]

WANG ZW, YAN HJ, CHEN Y, et al., 2016. Simultaneous determination of emodin and physcion in *Polygonum multiflorum* by quantitative ^{1}H NMR[J]. J Pharm Anal, 36(12):2163-2167. [王志伟，闫慧娇，陈跃，等，2016. 氢核磁共振法测定何首乌中大黄素和大黄素甲醚的含量[J]. 药物分析杂志，36(12):2163-2167.]

ZHAO XJ, WANG HF, ZHAO DQ, et al., 2013. Isolation and identification of the chemical constituents from roots of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels[J]. J Shenyang Pharm Univ, 30(3):182-185, 221. [赵雪娇，王海峰，赵丹奇，等，2013. 当归化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报，30(3)：182-185, 221.]

ZHAO YW, NAN ML, YU M, et al., 2016. Box-behnken response surface method was used to optimize the extraction process of total isoflavones from the roots of *Amorpha fruticosa*[J]. Chin Tradit Patent Med, 38(05): 1177-1179. [赵昱玮, 南敏伦, 于淼, 等, 2016. Box-Behnken响应面法优化紫穗槐根中总异黄酮提取工艺[J]. 中成药, 38(05):1177-1179.]

ZHOU GS, YAGN NP, TANG YP, et al., 2012. Chemical constituents from the aerial parts of *Angelica sinensis* and their bioactivities[J]. Chin J Nat Med, 10(4):295-298. [周桂生，杨念云，唐于平，等，2012. 当归地上部分的化学成分及其生物活性研究[J]. 中国天然药物，10(4)：295-298.]

ZHOU J, CHEN ZY, CAI Q, et al., 2019. Optimize ultrasonic-assisted extraction process of the hypoglycemic components from rhizoma *coptidis-siraitia grosvenorii* compound by response surface method[J]. Chem Res Appl, 31(06):1021- 1027. [周吉，陈章元，蔡芹，等，2019. 响应面法优化黄连-罗汉果药对中降糖成分的超声提取工艺研究[J]. 化学研究与应用，31(06)：1021-1027.]